



Bel BioLab

Протокол рутинной амплификации с использованием Diamant TaqD ДНК-полимеразы (с детекцией продуктов амплификации с помощью гель электрофореза).

Все компоненты ПЦР смеси перед использованием должны быть разморожены и хорошо перемешаны.

Мы предлагаем проводить ПЦР в объеме реакционной смеси 25 мкл. Можно также проводить ПЦР в меньших объемах. Для этого уменьшите в соответствующее число раз приводимые ниже количества.

1. Приготовьте 25 мкл следующей смеси используя 0,2 мл пробирки.

Компонент	Объем (μl)	Конечная концентрация
10-кратный буфер G	2,5	1-кратный
дНТФ 10 mM	0,2	0,2 mM
MgCl₂ 50 mM	2,5 - 5	2 - 5 mM
Прямой праймер (50 μM)	0,2	0,4 μM*
Обратный праймер (50 μM)	0,2	0,4 μM*
ДНК матрица	Определяется пользователем	1 pg – 10 ng плазмидной, фаговой или ВАС ДНК; 0,1-100,0 ng геномной ДНК
Diamant TaqD (5 U/μl)	0,2 - 0,48	0,04 - 0,016U/μl
H₂O	Довести реакционную смесь до 25 мкл	

* - Оптимальная концентрация праймеров может находиться в диапазоне 0,2 – 1 μM.

2. Аккуратно смешайте и отцентрифугируйте.
3. Условия проведения ПЦР

Мы рекомендуем следующую стандартную схему амплификации:

Начальная денатурация	95°C	2 мин
25-35 циклов	95°C	10 секунд
	55°C – 67 °C	10 секунд
	72°C	60 секунд на 1 000 п.о.*
Финальная элонгация	72°C	5 минут
Хранение	4°C	∞

* Длина амплифицируемого фрагмента не должна превышать 5 000 п.о.

4. После окончания амплификации внесите в пробу буфер для загрузки образца в гель и нанесите 3-10 мкл ПЦР смеси в лунку геля с необходимым процентом агарозы для анализа ампликона.